

Denaturation of Proteins by Freezing and Thawing (蛋白質の凍結変性に関する研究)

著者	四釜 慶治
号	62
発行年	1965
URL	http://hdl.handle.net/10097/23175

氏 名・(本籍)	し かま けい じ 四 釜 慶 治
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	理 第 6 2 号
学位授与年月日	昭和 4 0 年 2 月 1 7 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
最 終 学 歴	昭和 3 5 年 3 月 東北大学大学院理学研究科修士課程修了
学位論文題目	Denaturation of Proteins by Freezing and Thawing (蛋白質の凍結変性に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 青 木 廉 教授 元 村 勲 教授 小 泉 正 夫 教授 長 尾 昌 之

論 文 目 次

- 第 1 章 序 論
- 第 2 章 カタラーゼ及びミオシンの凍結変性
- 第 3 章 DNA 二重螺旋構造の安定性におよぼす熱及び凍結の影響
- 第 4 章 蛋白質の凍結変性機構に関する考察及び結論
- 後 記

論 文 内 容 要 旨

第 1 章 序 論

近年主として低温保存の目的から、種々の生物学的材料——組織、赤血球、ガン細胞、精子、ウイルス等——が凍結融解の過程において受ける損傷につき多くの研究が行われて来た。かゝる凍害の機構を真に理解する為には、まず原形質の主成分たる蛋白質につき、その凍結変性過程を基礎的に研究することが必須と考えられる。しかしながら従来蛋白質分子レベルに於ける研究はほとんど行われていない。

そこで著者は酵素蛋白カタラーゼ、及びミオシン A、B を高純度に単離精製し、それらの凍結変性過程を詳細に検討した。その結果これらの蛋白質の変性は明確な温度範囲にのみ起るものであることが明らかとなった。従来尿素や熱等による蛋白質の変性機構は全く分子内水素結合の破壊によるものと考えられている。しかし凍結変性における臨界温度範囲の存在をかかゝる観点から説明することは全く困難である。この点を更に検討する為に塩基間水素結合系から成る生体高分子 DNA につき、その安定性におよぼす凍結融解の影響を調べた。

最後に著者は蛋白質の凍結変性過程を氷の結晶状態との関連において考察し、蛋白分子内側鎖間の疎水結合の破壊を通じて変性の生ずる可能性を指摘した。

第 2 章 カタラーゼ及びミオシンの凍結変性

1. 材料及び実験方法

ヘム蛋白質カタラーゼは牛の肝臓から、筋肉蛋白質ミオシン A 及び B はウサギの骨格筋より、それぞれ単離精製した。酵素溶液 0.5 ml を試験管に取り種々の温度の冷却槽中に浸して凍結させた。一定時間後その凍結試料を直ちに 25°C の恒温槽で融解して、残存活性及び溶解度等を測定した。

2. 変性の臨界温度範囲の出現

カタラーゼ及びミオシン A、B はいずれも凍結後 10 分以内に部分的失活（変性）を示し、その程度は種々の実験条件に依存している。例えば酵素濃度、酵素溶液の PH、凍結温度等である。凍結温度を -19.2°C 迄調べた限りでは、これら酵素蛋白質が凍結融解の過程で変性を受けるのに或る臨界温度範囲の存在することが明らかとなった。最大変性率を与えるその温度範囲はカタラーゼについては -12°C から -7.5°C、ミオシンに関しては -20°C から -7.2°C であった。

3. 変性の諸過程

カタラーゼ溶液を -6.5°C 或は -19.2°C で前凍結後（これらの場合には全々失活しない）、それを融かさずに直ちに -3.0°C（変性の臨界温度範囲）へ移した場合、いずれの場合にも 10 分以内に 20% の失活率を示す。この値は直接 -3.0°C で凍結した場合に生ずる失活率と一致している。一方これとは反対に変性の臨界温度範囲内ですでに 10 分間凍結したものを直ちに -19.2°C へ移しても何等回復は認められない。ミオシンに関してもこの事情は全く同様である。これらの事実は変性の生ずる上記臨界温度範囲においては氷の結晶状態に変化があることを暗示している。 -12°C から -20°C に見られる臨界温度の上限は変性を引き起こす為の氷の生成が不十分であることに基くものと考えられる。一方 -7.5°C 附近に現われる非常に明確な臨界温度の下限は氷の結晶状態の転移温度に対応している（六方晶系——等軸晶系、或は無晶系）。従つて現象的には臨界温度範囲における蛋白質の変性は六方晶系の氷の生成に基くものと考えられる。他方等軸晶系或は無晶系の氷の生成下においては蛋白質は安定に保たれると考えられる。

4. 変性の保護作用物質

カタラーゼ及びミオシンの凍結変性に対する種々の物質の保護作用を検討した。

glycerol, ethylene glycol, sucrose, glucose, gelatin, 無機電解質, 脂肪酸類, ovalbumin 等の

保護効果は顕著であつた。

第3章 DNA=螺旋構造の安定性におよぼす熱及び凍結の影響

1. 材料及び実験方法

コウシ胸腺DNAを用いた ($E(p)=6650$, $\lambda_{\max}=259m\mu$)。

熱変性に関しては $3.5ml$ の DNA 溶液 ($30\mu g/ml$) を共栓付試験管に取り各温度の恒温槽中で一定時間加熱後、直ちに $0^{\circ}C$ へ急冷して $259m\mu$ の吸光度の増大を測定した。一方凍結実験においては同量の DNA 溶液を各低温で凍結後、直ちに $20^{\circ}C$ で融解して、紫外部吸光度の変化を測定した。

2. DNAの熱変性

紫外部吸光度の増加は加熱後 10 分以内で平衡に達しその後一定の値に保たれる。この hyper-chromic effect は DNA の塩基間水素結合 ($A=T$, $G=C$) の切断により、塩基の規則正しい積み重ねがくずれたことによるものと考えられている (DNA の変性)。0.5 mM phosphate buffer, PH7.0 においては $259m\mu$ の吸光度の最大増加率は約 30% であり, melting temperature (T_m) は $59.0^{\circ}C$ であつた。又この熱変性過程においては, $\Delta H=39.4 Kcal/mole$, $\Delta s=118.6 e \cdot u$, $\Delta G=0(59.0^{\circ}C)$ であつた。

3. 凍結融解の影響

DNA 二重螺旋構造 (塩基間水素結合系) の安定性におよぼす凍結融解の影響を種々の条件下で検討した。— $192^{\circ}C$ 迄の温度範囲に渡つて調べた限りでは、紫外部吸収の増大は全く認められずむしろ減少の傾向さえみられた。従つて DNA helix の塩基間水素結合系は凍結融解によつては全く破壊されないと結論されよう。この事実は蛋白の凍結変性と比較して極めて興味のあるところである。

第4章 蛋白質の凍結変性機構に関する考察及び結論

1. 蛋白分子内結合

蛋白分子の立体構造は種々の分子内結合によつて維持されている。例えばペプチド—NH, —CO 基間の水素結合の他に、側鎖残基間の水素結合、疎水結合、イオン結合、—S—結合等がある。ところで蛋白質は凍結によつて変性する。即ち Native な蛋白分子周辺の水の構造の変化によつて変性を受ける。従つてもしも上記分子内結合のうちで、その性質が周囲の水の構造に不可避的に依存していて、それ故に周囲の水の構造の変化によつて最も大きく影響されうる分子内結合があれば凍結変性の機構もかゝる観点から考察されなければならない。

2. 疎水結合

疎水結合とは水の中で蛋白分子の非極性側鎖間に生ずる相互作用のことである (Ala, Val, Leu, Ileu, Met, Cysh, Phe 等の側鎖, 出現頻度 35%)。この結合には非極性残基間の Van der Waals 力よりも、その周辺の水の構造の変化による寄与の方がはるかに大きいと考えられている。しかも Frank and Evans (1945) の "icebergs" Theory により疎水結合周辺の水は、より結晶性の方向へ変化し、その結果結晶性水和物類似の構造を取ると期待出来る。即ちこの水和格子は普通の氷の六方晶系とは異つて、等軸晶系と考えられる。

3. 凍結変性機構

上記疎水結合に関与している周辺の水の構造が何等かの手段によつて乱されるならば、それは疎水結合の破壊を引き起し、更にそれは蛋白の高次構造の破壊 (即ち変性) を導くものと考えられる。— $75^{\circ}C$ 迄の凍結では、六方晶系の氷が形成され、その結果疎水結合周辺の水の構造 (等軸晶系と考えられる) を攪乱して疎水結合を破壊するに至るものと考えられる。一方— $80^{\circ}C$ 以下の凍結で

は、等軸晶系或は無晶系の氷の生成により、疎水結合周辺の水の構造は比較的安定に保たれるものと考えられる。

従来蛋白質の変性は全く分子内水素結合の破壊によるものと考えられて来た。しかし、この観点から凍結変性における臨界温度範囲の出現、及び変性の諸過程を説明することは全く困難である。この事情はDNAの水素結合系が凍結融解に対して全く安定である事実によつても裏付けられる。そこで疎水結合周辺の特殊な水の構造を考察した結果、その破壊を通じて凍結変性の生ずる可能性を指摘した。

疎水結合の特異な性質は単に蛋白質の変性に関してのみならず、蛋白分子の示す諸反応や、蛋白質と脂質との相互作用等々において、今後極めて興味ある諸問題を提起するものと考えられる。

後 記

この論文の内容のうち、

第二章は

Denaturation of Catalase and Myosin by Freezing and Thawing.

Shikama, K. Sci. Rep. Tohoku Univ. Ser. IV, 29 (1963), 91—106.

第三章は

Thermal and Freezing Denaturation of Deoxyribonucleic Acid.

Shikama, K. Sci. Rep. Tohoku Univ. Ser. IV, 30 (1964), 133—141.

に掲載されたものである。

参 考 論 文

- 1 Denaturation of Catalase by Freezing and Thawing.
Shikama, K. and I. Yamazaki Nature, 190 (1961), 83—84.
- 2 抗生物質のミトコンドリア呼吸系に対する作用
萩原文二, J. L. Conelly, 四釜慶治, 押野礼子, 奥貫一男
酵素化学シンポジウム 17, 58 (1962)
- 3 Chromatography of Oxy- and Met-myoglobin on Diethylaminoethyl Cellulose Columns.
Shikama, K. Sci. Rep. Tohoku Univ. Ser. IV, 30 (1964), 1—9
- 4 Preparation of Crystalline Oxymyoglobin from Horse Heart.
Yamazaki, I., K. Yokota and K. Shikama J. Biol. Chem., 239 (1964), No. 12
in Press.

論 文 審 査 要 旨

四釜慶治の論文は凍結による蛋白の変性機構を解明する目的で行つた研究に関するものである。

すべての生細胞は内部が凍結すると例外なしに傷害を受け死に至る。この根本的原因是原形質の重要な構成要素であり、生物の特徴ある機能の担手である蛋白の凍結による変性にあると考えられてゐるが、未だその変性の本質及びその具体的過程は不明である。これらの点を解明するため簡単な蛋白系、すなわち酵素の水溶液について実験を行つた。

酵素溶液としてカタラーゼ、ミオシンAおよびBの水溶液を用い、その酵素活性の低下度を変性のindexとして、まづ凍結時間、酵素濃度、PH等の影響についての厳密な実験により決めた最適の実験条件下で、酵素蛋白の変性に及ぼす凍結温度の影響を調べた。カタラーゼ溶液について明らかにされた主なものは次の通りである。(1)凍結変性の起こるのはある定つた温度範囲($0^{\circ}\text{C} \sim -80^{\circ}\text{C}$)に限られている。(2)この温度範囲において起こる変性の程度は凍結温度に無関係にだいたい一定値を示す。この関係はミオシンA及びBについても同様であつた。この事実は初めて明らかにされたもので非常に示唆に富む発見である。

現在一般に蛋白質の変性は主として蛋白分子内の水素結合の切断されることが原因となつて蛋白分子の高次構造が破壊されることに基くと考えられている。凍結による蛋白の変性も同じ機構に基くか否かを検討するため、塩基間水素結合系から成る生体高分子のDNAを用い、凍結による変性を259 m μ の吸光係数の増加度で調べた。その結果 0°C より -190°C までの凍結温度範囲では吸光係数の増大は全く認められず、むしろ減少の傾向さえ示した。この事実はDNA分子内塩基間の水素結合は凍結融解に対し安定であることを示す。つまり凍結による蛋白変性は蛋白分子内の水素結合の破壊によつて起こり始めるものとは考えられない。

この他生物材料の長期凍結保存のさい凍害防止剤として用いられているグリセリン、その他ゲラチン、糖、塩などの作用も調べたが、これら物質は明らかに凍結変性を抑制する作用があり、特にゲラチン(0.01%)の効果は著しかつた。しかし凍結変性の起こる温度範囲は変らなかつた。

以上の実験結果を基に種々の考察を行つている、蛋白の凍結変性が凍結温度に依存していることは、生じた氷の構造の差異が蛋白変性に密接に関係していることを示すものである。ふつうの氷は六方晶系であるが、約 -80°C 以下の温度で凍り始めるときは等軸晶系あるいは無定形の氷が生ずる。この結晶状態の転移温度が凍結変性の起こる下限の温度とだいたい一致する。一方Klotzの研究によると蛋白分子の非極性残基周辺の氷は等軸晶系の結晶構造を有し、この氷を介して蛋白分子内の非極性残基間に疎水結合が生ずるという。この疎水結合も蛋白分子の高次構造に寄与していると考えられるので、非極性残基周辺の氷の構造が乱されると蛋白分子の高次構造は非常に不安定となり、遂には破壊され変性が起こると考えられる。したがつて -80°C 以上の温度では生じた六方晶系の氷晶により蛋白分子周辺の等軸晶系型の分子配列をとつている氷の構造が乱される結果、疎水結合は切断され、これが原因となつて変性が起こる。また -80°C 以下では生ずる氷晶が等軸晶系のため氷の構造は変化を受けず、したがつて疎水結合は安定であると説明される。以上の考え方によれば -80°C 以上の温度範囲でのみ変性の起こる事実よく理解できる。なお凍害防止剤の変性保護作用は蛋白分子表面の氷の構造の安定化にあると思われる。以上の論議から凍結による蛋白分子表面の氷の構造破壊が凍結変性の一つの基本的原因であらうと推定したのである。

以上の研究は蛋白の凍結変性に新知見を加えたのみでなく、今後の凍結変性の機構解明に新しい道をひらいたもので、この方面の研究に重要な貢献をしたものである。よつて四釜慶治提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。